

市販味噌に混入させた大腸菌0157の消長

著者	細谷 幸恵, 川崎 晋, 前田 憲成, 稲津 康弘
雑誌名	日本食品科学工学会誌
巻	67
号	10
ページ	376-383
発行年	2020-10-15
その他のタイトル	Fate of Escherichia coli 0157 Spiked into Commercially Available Fermented Soybean Paste (miso)
URL	http://hdl.handle.net/10228/00008494

doi: <https://doi.org/10.3136/nskkk.67.376>

研究ノート

市販味噌に混入させた大腸菌 O157 の消長

細谷幸恵^{1,2}, 川崎 晋¹, 前田憲成², 稲津康弘^{1*}

¹ 農研機構 食品研究部門 食品安全研究領域

² 九州工業大学大学院 生命体工学研究科 生体機能応用工学専攻

Fate of *Escherichia coli* O157 Spiked into Commercially Available Fermented Soybean Paste (miso)

Yukie Hosotani^{1,2}, Susumu Kawasaki¹, Toshinari Maeda² and Yasuhiro Inatsu^{1*}

¹ Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

² Graduate School of Life Science and System Engineering, Kyushu Institute of Technology,
2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu, Fukuoka 808-0196

This study investigated the fate of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157 spiked into 24 commercially available fermented soybean paste (miso) samples. Viable cell numbers of the inoculated *E. coli* O157 at storage conditions of 5, 10, 20, or 30 °C were measured by the agar plate method or most probable number method. Cell numbers of *E. coli* O157 decreased gradually in all tested samples. The decreases in *E. coli* O157 numbers depended mainly on the water activity of samples. Decreases in the contamination level of *E. coli* O157 did not depend on the ingredients of miso samples (malted rice, wheat, and soybean). The obtained results suggest that the commercial risk of accidental *E. coli* O157 contamination is practically negligible because of high cell mortality during transportation and storage processes at room temperature.

(Received Mar. 16, 2020 ; Accepted May 28, 2020)

Keywords : *Escherichia coli* O157, fermented soybean paste

キーワード : 大腸菌 O157, 味噌

厚生労働省「食中毒統計」によると 2002 年から 2018 年の 17 年間に 21852 件の食中毒事件が起こっており、うち 15744 件 (72.0%) は原因食品が特定されている。この期間に味噌を用いた食品による細菌性食中毒事件は 7 件発生している (表 1)。2008 年には、味噌加工食品の一種として、野菜をもちろみで漬け込むことで製造される金山寺味噌を原因とした黄色ブドウ球菌食中毒事件が発生しているが、これまで、味噌そのものを原因食品とする食中毒事例は発生していない。したがって、国内で販売される味噌に食中毒原因菌が含まれる可能性は極めて低いといえる。一方、味噌業界の中には味噌の微生物学的安全性に対する情報を求める声もある。特に腸管出血性大腸菌は数～数十 CFU の菌数の経口摂取でも腸管上皮に付着して感染が成立し、そこでペロ毒素を生産することでヒトに対して強い病原性を示すことがある大腸菌である。その代表的な血清型が O157 : H7 であるが H 抗原を持たないもの (以下「O157」と表記する) や、O26 や O111 など O 抗原型が異なるものも存在する¹⁾。また全ての大腸菌 O157 (: H7) その他の血清型株がペロ毒素を生産するわけではない。

2018 年 6 月 13 日に食品衛生法等の一部を改正する法律が公布され、原則として全ての食品等事業者は HACCP に基づくまたはその考え方を取り入れた衛生管理が求められるようになった。長期に渡る食経験と上述した食中毒の発生頻度を踏まえると、味噌は食中毒のリスクが極めて低い食品であると考えられる。しかしその製造に HACCP の考え方を取り入れることにするのであれば、何らかの根拠に基づいた衛生管理を行う必要がある。また、2018 年の味噌の製造量は 478068 t であり¹⁾、その 3.6% にあたる 17010 t が輸出されている²⁾ が、更なる味噌の海外輸出促進のためには、購入先 (国) に対して安全性の根拠を明確に示すことができることが理想であるといえよう。

食品表示基準 (平成 27 年内閣府令第 10 号、最終改正 平成 30 年 9 月 21 日内閣府令第 43 号) によると、みそは蒸煮大豆と食塩を必須原料とする半固体状の発酵食品であって、これは更に米こうじと仕込むもの (米みそ)、大麦やはだか麦こうじと仕込むもの (麦みそ)、大豆を豆こうじにして仕込むもの (豆みそ)、および異なる味噌を混合する、あるいは複数の麹 (米こうじ、麦こうじ、豆こうじ) で仕込

¹ 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12, ² 〒808-0196 福岡県北九州市若松区ひびきの 2-4

*連絡先 (Corresponding author), inatsu@affrc.go.jp

表 1 味噌に関連する食品による食中毒事件

発生年	原因食材	原因菌
2000 年	バカ貝の酢味噌和え	腸炎ビブリオ
2006 年	鯖の味噌煮	サルモネラ
	味噌付けキリタンポ	セレウス菌
2007 年	サワラ味噌焼き定食	サルモネラ
2008 年	金山寺味噌	黄色ブドウ球菌
2015 年	なす酢みそ和え	黄色ブドウ球菌
2014 年	タコとわかめの酢味噌かけ	腸炎ビブリオ

厚生労働省「食中毒統計」を元に作成した。

むもの（調合みそ）の 4 種類に分類される。その塩分量は代表的な米味噌で 12% (w/w) 前後、麦味噌や豆味噌は 10~11% (w/w) である²⁾が、近年では低塩（減塩）味噌も製造されるようになってきている。市場に流通するものは自社従来品や日本食品成分表記載値と比べ 15~25% (w/w) 塩分を減らしたものが主流で、塩濃度は 8~10% (w/w) であるが、近年ではさらに低塩分の味噌も製造されている。

味噌中における安全性や品質に悪影響を与える細菌の死滅は、加塩による水分活性の低下と熟成過程における発酵によって生成した有機酸等の相乗効果によって生じると考えられている³⁾。味噌の水分活性 (Aw) はその種類にもよるが、おおむね 0.7 台にあり³⁾、また適切に製造された通常の味噌の pH はおおむね 4.8~5.2 であるとされる⁴⁾。

塩濃度と pH が大腸菌の死滅挙動に与える影響に関しては以下のような試験管内試験の結果が報告されている。まず塩化ナトリウム濃度および pH を変えた液体培地（トリプティケースソイブイオン）にて 37℃ で培養した場合、腸管出血性大腸菌 O157 : H7 は塩化ナトリウム濃度 6.5% (w/v) (aw=0.95) までは増殖するが 8.5% (w/v) (aw=0.93) 以上では徐々に死滅し、また pH 7.0~5.0 以上では増殖するが pH 4.5 以下では徐々に死滅することが示されている⁵⁾。次に大腸菌 O157 : H7 はそれ以外の血清型の大腸菌よりも耐酸性が強い傾向があり、またいずれの大腸菌であつても pH 4.0 のブレインハートインフュージョン (BHI) 培地中における生存率は 30℃ より 25℃ の方が高いことが示されている⁶⁾。さらに近年の研究によると、高い塩濃度 (9~15% (w/v)) 条件下では大腸菌 O157 : H7 に対する酢酸の殺菌効果が減少することも示されている⁷⁾。しかし大腸菌 O157 が味噌の製造、保存過程で混入した場合に、通常、想定される保存温度においてどの程度の時間でどの程度の大腸菌 O157 生菌数の低下が生じるのかという点の詳細については、これらの研究結果からは明らかではない。

血清型 O157 以外の大腸菌を用いて 1980~90 年代に行われた研究^{8)~11)}によると、製造工程中の味噌に混入させた大腸菌は熟成過程で死滅する、あるいは製造後の味噌に混入させた大腸菌は室温 (12℃ 以上) の保存条件下では 2~6

日ほどで検出限界以下まで減少するものの、冷蔵 (5℃) 保存条件下では 10 日以上生存することが報告されている。ただしこれらの実験は菌の種間差や味噌の種類の違いに起因する大腸菌の死滅特性の違いについて十分な検討が行われているとはいいがたく、またこれらには十分な反復試験が行われていないために信頼性を評価することが困難な実験結果も含まれる。これに加え、近年では「減塩」「だし入り」等、種々の味噌製品が製造されていることから、これらの新製品の特性を考慮した上で、味噌の微生物学的安全性に関する再検討を行う必要がある。

そのような理由から、本研究では味噌製造業界のニーズ等も踏まえつつ、市販味噌の微生物学的安全性に関する科学的証拠を得ることを目的として、低温~常温の温度域における各種味噌中での大腸菌 O157 の死滅特性を測定した。

1. 実験方法

市販味噌の販売状況を元に中央味噌研究所が選定した 24 種類（原料：米 16 種類、豆 2 種類、麦 3 種類および割合 3 種類）を実験に用いた（表 2）。商品開封直後に一部の味噌を取り、pH 計測 (LAQUA F-74, (株)堀場製作所, 京都)、食塩濃度計測 (PAL-SALT, (株)アタゴ, 東京)、水分活性値計測 (AQUALAB a_w meter, Decagon Devices, Inc.), ならびにエタノール濃度測定 (F-キットエタノール, Roche Diagnostics GmbH) を行った。ウシ糞便から分離された、ベロ毒素生産性を有しない大腸菌 O157 株 5 種類 (CR-3, MN-28, MY-29, DT-66 および CE-278) のリファンピシン耐性自然突然変異株を以下の試験に用いた。それぞれの菌の -80℃ 凍結保存株を 50 mg/L のリファンピシン (和光純薬, 大阪) を含むソルビトールマッコンキー寒天培地 (日水製薬, 東京) 上に塗布し、37℃ で 24 時間培養した（以下、リファンピシン濃度、培養温度および培養時間はいずれの培地についても同様）。寒天平板上で発育した、ソルビトール発酵性を持たない典型コロニーを白金耳によりかき取り、これを 5 mL のリファンピシン添加ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地 (日水製薬, 東京) に接種して、恒温マルチシェーカー (MMS-3010, 東京理科機械, 東京) にて 37℃, 170 rpm の条件で振盪培養し、菌体の回復を行った。16 時間の回復培養を行った後、これらをほぼ同一の濁度となるように塩濃度 0.85% (w/v), pH 6.5 のリン酸緩衝食塩水 (PBS) にて微調整し、これらの菌液を同体積ずつ混合することで味噌接種用の菌液を作成した。なお濁度測定には分光光度計 (Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences(株)) を用い、660 nm の測定条件で計測を行った。複数の菌株を混ぜて使用した理由は、菌株によって死滅性が異なる可能性があることから、その影響を低減するためであり、この種の接種試験では一般的に行われていることである¹²⁾¹³⁾。

表 2 に示した味噌をそれぞれ滅菌済みプラスチックカッ

表 2 検体の物性および 10℃, 20℃ 保存後の菌数低下

種類		pH	エタノール濃度 (% (w/w))	塩分濃度 (% (w/w))	水分活性	菌数低下 (log CFU/g)	
						(10℃, 14 日)	(20℃, 3 日)
米		5.40±0.23 ^a	0.15±0.02 ^a	12.8±1.6 ^a	0.74±0.05 ^a	1.6±0.3 ^{d,e,f,g}	0.8±0.5 ^{g,h}
米		5.43±0.24 ^a	0.15±0.02 ^a	12.6±1.3 ^a	0.75±0.05 ^a	1.6±0.4 ^{d,e,f,g}	1.1±0.3 ^{f,g,h}
米		5.42±0.22 ^a	0.13±0.02 ^a	12.4±1.5 ^a	0.73±0.05 ^a	1.2±0.9 ^{f,g}	1.3±0.8 ^{e,f,g,h}
米		5.36±0.22 ^a	0.15±0.02 ^a	12.0±1.9 ^a	0.73±0.06 ^a	0.9±0.5 ^{f,g}	1.3±0.3 ^{e,f,g,h}
米		5.40±0.20 ^a	0.16±0.02 ^a	12.4±1.5 ^a	0.73±0.06 ^a	1.0±0.5 ^{f,g}	1.2±0.4 ^{e,f,g,h}
米		5.36±0.27 ^a	0.17±0.02 ^a	13.0±1.0 ^a	0.74±0.06 ^a	1.3±0.4 ^{e,f,g}	1.7±0.2 ^{d,e,f,g,h}
米		5.40±0.27 ^a	0.13±0.02 ^a	12.8±1.1 ^a	0.74±0.07 ^a	0.8±0.3 ^g	1.1±0.2 ^{f,g,h}
米		5.35±0.32 ^a	0.14±0.02 ^a	13.2±1.6 ^a	0.77±0.06 ^a	1.9±0.5 ^{d,e,f,g}	2.7±0.5 ^{b,c,d}
米		5.37±0.26 ^a	0.13±0.02 ^a	12.8±1.1 ^a	0.75±0.07 ^a	1.0±0.6 ^{f,g}	1.2±0.7 ^{f,g,h}
米		5.50±0.19 ^a	0.17±0.02 ^a	12.8±1.1 ^a	0.78±0.06 ^a	1.2±0.5 ^{f,g}	1.9±0.5 ^{d,e,f,g,h}
米	アルコール添加	5.61±0.24 ^a	0.18±0.02 ^a	11.8±1.1 ^a	0.76±0.05 ^a	1.9±0.2 ^{d,e,f,g}	2.2±1.0 ^{d,e,f}
米	アルコール添加	5.64±0.20 ^a	0.18±0.02 ^a	12.6±1.3 ^a	0.76±0.05 ^a	3.1±0.4 ^{b,c,d}	3.2±0.5 ^{b,c}
米	アルコール添加	5.40±0.27 ^a	0.15±0.02 ^a	12.4±1.5 ^a	0.78±0.05 ^a	4.0±0.9 ^{a,b,c}	5.0±1.1 ^a
米	アルコール添加だし入り	5.77±0.19 ^a	0.16±0.02 ^a	12.2±1.3 ^a	0.77±0.05 ^a	4.0±1.3 ^{a,b}	4.0±1.1 ^a
米	アルコール添加だし入り	5.56±0.26 ^a	0.17±0.02 ^a	12.8±1.1 ^a	0.75±0.05 ^a	1.6±0.5 ^{d,e,f,g}	1.4±0.4 ^{e,f,g,h}
米	減塩	5.71±0.25 ^a	0.18±0.02 ^a	5.5±0.8 ^b	0.82±0.05 ^b	0.6±0.3 ^g	1.0±0.4 ^{g,h}
麦		5.34±0.18 ^a	0.13±0.02 ^a	10.6±1.3 ^a	0.72±0.01 ^a	1.4±0.2 ^{e,f,g}	1.0±0.4 ^{g,h}
麦	アルコール添加	5.45±0.21 ^a	0.15±0.02 ^a	10.8±1.6 ^a	0.71±0.01 ^a	2.8±0.4 ^{c,d,e}	2.6±0.4 ^{b,c,d,e}
麦	アルコール添加	5.43±0.24 ^a	0.18±0.02 ^a	11.0±1.4 ^a	0.72±0.01 ^a	1.8±0.4 ^{d,e,f,g}	2.0±0.4 ^{d,e,f,g,h}
豆		5.18±0.27 ^a	0.12±0.02 ^a	11.8±1.6 ^a	0.71±0.01 ^a	1.5±0.4 ^{e,f,g}	1.1±0.3 ^{f,g,h}
豆	アルコール添加だし入り	5.38±0.24 ^a	0.04±0.02 ^a	12.2±1.8 ^a	0.73±0.01 ^a	4.6±0.8 ^a	3.8±0.6 ^{a,b}
調合	A	5.21±0.27 ^a	0.14±0.02 ^a	11.0±1.5 ^a	0.70±0.01 ^a	1.2±0.4 ^{f,g}	1.1±0.3 ^{f,g,h}
調合	B	5.46±0.25 ^a	0.11±0.02 ^a	12.8±1.6 ^a	0.71±0.01 ^a	1.1±0.3 ^{f,g}	0.7±0.4 ^h
調合	アルコール添加だし入り	5.50±0.27 ^a	0.14±0.02 ^a	12.6±1.3 ^a	0.72±0.01 ^a	2.4±0.6 ^{d,e,f,g}	2.1±0.5 ^{d,e,f,g}

数ヶ月おきに異なるロットを用いて 5 回測定を行った結果の平均値と標準偏差を示した。

添え字が異なる同一列の測定値は有意差がある ($P<0.01$)

プに 200 g 入れ、これに上述した接種菌液 1.0 mL を添加したのちに、5 分以上の十分な攪拌を行うことで、8 log CFU/g の初発大腸菌 O157 数を持つ検体を作成した。大腸菌を混入させた検体は 5, 10, 20 および 30℃ の 4 温度帯で保存し、一定時間ごとに十分、混合後、10 g をサンプリングした。なお保存期間は 5, 10, 20 および 30℃ の保存温度につきそれぞれ 112 日, 91 日, 18 日および 12 日とした。

サンプルは 9 倍重量の PBS とともに、ホモジナイザー (Pro.mediaSH-II M, (株)エルメックス, 埼玉) を用いて 1 分間のストマック処理を行い乳剤化した。その原液および PBS を用いて段階的に希釈したものを希釈段ごとに 1 mL 用いて、混濁平板法により寒天平板を作成した。これらの寒天平板は 35℃, 24 時間の培養の後に、生菌数の計測を行った。この生菌数計測はリファンピシンを含む Trypticase soy agar (TSA, Difco, Becton, Dickinson and Company) 培地を用いた。なお、この培地を選択した理由として、ソルビトールマッコニー寒天培地等の選択培地を用いる場合よりも高い効率で、共存するほとんどの微生物による妨害を受けることなく、損傷菌の一部をも含めた大腸菌 O157 数を計数することができる¹²⁾。

統計学的な理由等により寒天平板 1 枚あたり 20 個以下

のコロニー数を採用しない場合、この方法による生菌数の測定限界は 200 CFU/g となることから、これより低い生菌数の最頻値は MPN (most probable number: 最確値) 法で測定した¹⁴⁾。3 つの希釈段それぞれにつきリファンピシン添加トリプティケースソイ培地入り試験管を 5 本ずつ使用し、37℃ で 24 時間培養を行った。菌の発育が見られたものについては培養液を 1 白金耳取ってこれをリファンピシン添加 TSA 培地に接種し、生じたコロニーのインドール反応を確認することで、MPN 管内の大腸菌 O157 の存在の有無を確認した。

表 2 に示した 24 種類の市販味噌について、それぞれ異なる製造ロットの味噌検体を収集し、これを用いて、以上述べた試験を 5 回繰り返し行った。それぞれの種類の味噌の pH, エタノール濃度, 塩分および水分活性について平均値と標準偏差 ($n=5$) を求めるとともに、Tukey-Kramer 法を用いて味噌の間で測定値の差があるか否か多重比較検定を行った (有意水準 1%)。得られた生菌数 (最頻値) は対数化した後に平均値と標準偏差 ($n=5$) を求めるとともに、同様に Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った (有意水準 1%)。全ての味噌の物性値 (pH, エタノール濃度, 塩分および水分活性) と寒天平板法で測定した生菌

数の低下 (10℃, 14 日間または 20℃, 3 日間保存前後) の測定値 (5 回分全て) を用いて, これら各々の間の相関係数を計算した。

市販味噌全体を母集団と考えた場合の菌数変化の様子を捉えるために, 24 種類全ての味噌の生菌数 (の最頻値) 測定値 (5 反復分) を用いて, 各保存温度における菌数の変化を示す箱ひげ図を作成した。なお平均値と標準偏差で結果を示さない理由は, 測定値に MPN 法で求めた最頻値が含まれるために, ノンパラメトリックな統計処理と結果の表示を行う必要があるからである。

以上の統計処理には「EXCEL 統計」((株)社会情報サービス社, 東京) を使用した。

2. 実験結果

実験に使用した 24 検体の pH, エタノール濃度, 塩分濃度および水分活性の平均値およびそれらの 95% 信頼区間はそれぞれ 5.44 (5.49-5.40), 0.15% (w/w) (0.15-0.14% (w/w)), 12.0% (w/w) (12.4-11.7% (w/w)) および 0.74 (0.75-0.73) であった (表 2)。また, pH, エタノール濃度および水分活性について検体間の有意な差は検出されなかった。塩分濃度については減塩米味噌 1 検体のみは他検体のそれ ($12.2 \pm 1.5\%$ (w/w)) と比較して有意に低い値 ($5.5 \pm 0.8\%$ (w/w)) を示し, これは他検体よりも塩分濃度が 6.7% (w/w) 低かった。24 検体 (5 反復) 全ての測定値を用いて計算した pH, エタノール濃度, 塩分濃度および水分活性それぞれの間の相関係数は -0.26 (エタノール濃度-食塩濃度) から 0.42 (エタノール濃度-水分活性) の範囲であり, それぞれの間に明確な相関関係があるとはいえなかった。

24 種類の味噌 (各 5 ロット) それぞれに添加した大腸菌 O157 生菌数の変化を測定した。味噌の種類による結果の違いを比較するため, 10℃で 14 日間または 20℃で 3 日間

保存した場合の生菌数 (対数値) の減少値を表 2 に示した。全体として見た場合, これら 2 保存条件下の生菌数低下に有意な差はなく, その相関係数は 0.89 と高い値を示した。いずれの保存条件についても味噌の pH, エタノール濃度, 塩分濃度および水分活性と生菌数低下の相関係数は -0.04 (水分活性, 10℃保存) ~ 0.13 (pH, 20℃保存) の範囲にあり, それぞれの物性値と生菌数低下の間に明確な関係は見いだされなかった。

24 検体全体として見た場合, いずれの保存条件においても味噌の原料あるいはアルコール添加の有無による, 統計学的に有意な大腸菌の死滅特性の違いは見いだされなかった。そのため, 24 検体全てを一括して市販味噌を代表するサンプルとみなし, それぞれの貯蔵温度における 24 検体×5 反復の全測定値を用いて, 貯蔵期間と生菌数 (の最頻値) の関係を示す箱ひげ図を作成した (図 1~4)。8 log CFU/g の初発菌量からスタートした場合, 5℃保存では 105 日後においても中央値 2.5 log CFU/g (最大値 4.5 log CFU/g ~ 最低値 -0.7 log MPN/g 以下) の大腸菌の生存が確認された (図 1)。10℃保存では 70 日目になくとも全体の 75% から大腸菌が検出されなくなったが (検出限界 -0.7 log MPN/g), 95 日目においても 1.5 log MPN/g の生菌数を示したものが存在した (図 2)。20℃保存では 12 日目に少なくとも全体の 75% から大腸菌が検出されなくなったが, 18 日目においても 2.2 log MPN/g の生菌数を示したものが存在した (図 3)。30℃保存では少なくとも 6 日目までは全体の 75% 以上から大腸菌が検出され (図 4), 12 日目においても 2.2 log MPN/g の生菌数を示したものが存在した。

また, pH, エタノール濃度, 塩分濃度および水分活性の測定値から, それぞれの要素について上位 4 分の 1 層 (以下, 上位層) および下位 4 分の 1 層 (以下, 下位層) に味噌

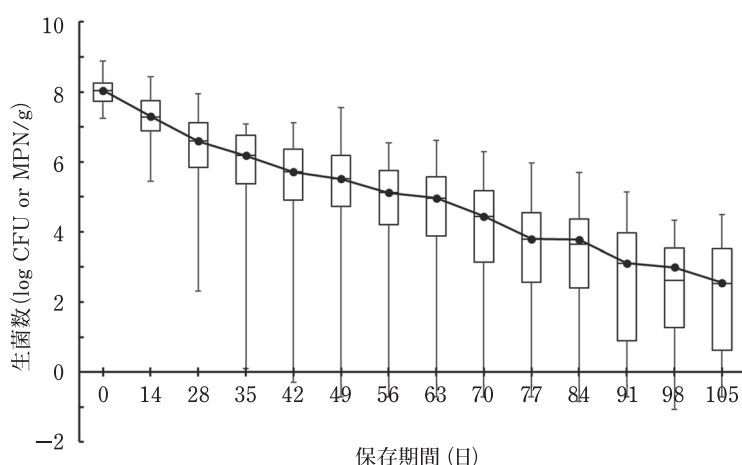


図 1 5℃保存における大腸菌 O157 生菌数の減少

24 検体 5 反復測定 ($n=120$) による生菌数の 0 (最低値), 25, 50 (中央値: ●), 75 および 100 (最大値) パーセンタイル値を示した (図 2~4 も同様)

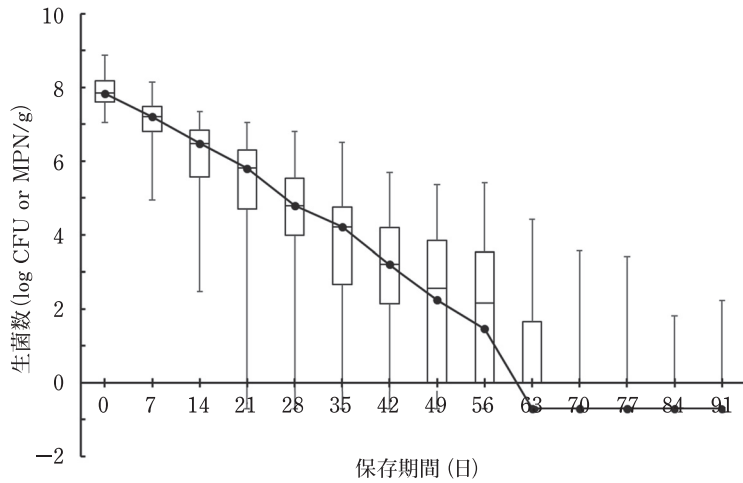


図 2 10℃保存における大腸菌 O157 生菌数の減少

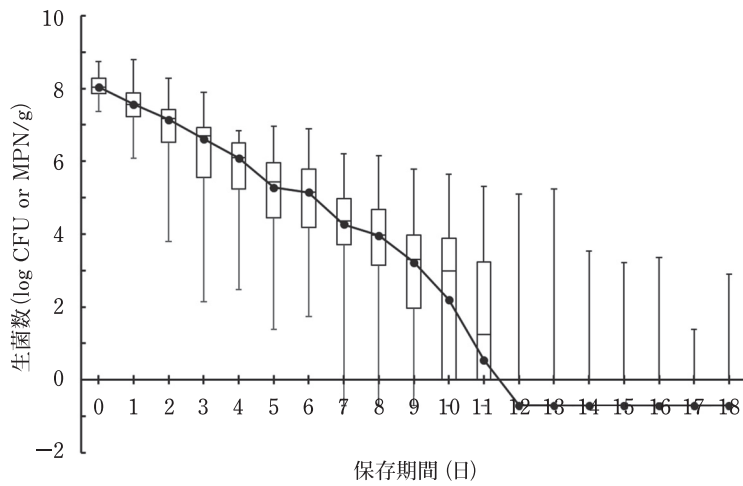


図 3 20℃保存における大腸菌 O157 生菌数の減少

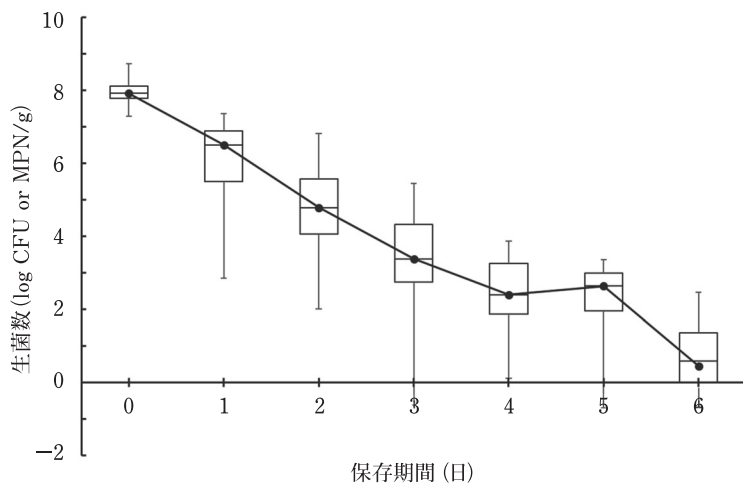


図 4 30℃保存における大腸菌 O157 生菌数の減少

検体をグループ化し、これらの化学的要素が大腸菌 O157 の死滅速度に与える影響について検討を行った。

5℃保存条件での試験区において、エタノール濃度（上

位層平均値：0.18% (w/w)，下位層平均値：0.11% (w/w))，pH（上位層平均値：pH5.6，下位層平均値：pH5.3），食塩濃度（上位層平均値：12.9% (w/w)，下位層平均値：10.4

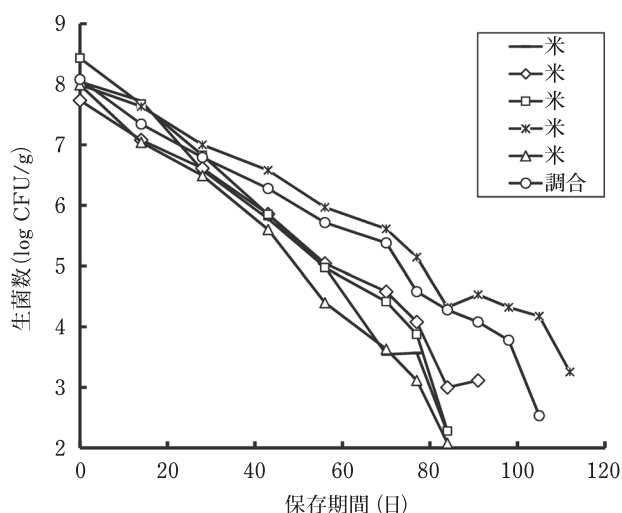


図 5 5℃保存における大腸菌 O157 生菌数（水分活性値下位 4 分の 1 層）

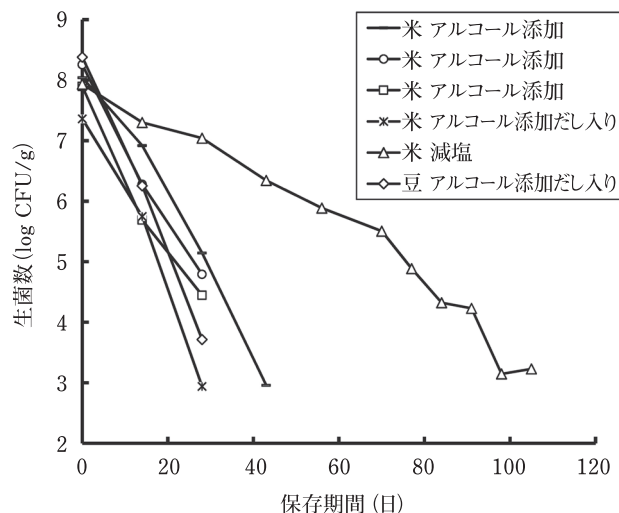


図 6 5℃保存における大腸菌 O157 生菌数（水分活性値上位 4 分の 1 層）

% (w/w) の各要素に関して、上位層と下位層の間に顕著な差異は見られなかった（データ未掲載）。一方、水分活性値（上位層平均値：Aw 0.78，下位層平均値：Aw 0.71）については、5℃保存条件下において水分活性値下位層の 6 検体すべてが寒天平板法の検出限界値以下になるまでに 80 日以上を要したが、水分活性値上位層では減塩味噌を除く 6 検体中 5 検体が、保存 45 日までに検出限界以下となった。

3. 考 察

伝統的な味噌は冷暗所での常温保存を前提とするものであり、これが微生物学的に極めて安全な食品であることは、わが国における長い食経験からも知られていることである。伊藤ら¹⁵⁾は全国各地の市販味噌 101 点（水分 37.5～59.7%，食塩濃度 5.1～14.3%，pH 4.61～5.22，全糖 3.9～36.1%）の大腸菌群、腸炎ビブリオおよび黄色ブドウ球菌を検査し、大腸菌群および腸炎ビブリオは全て陰性、32 点（65 工場中 29 工場）がブドウ球菌陽性（全てコアグラゼ陰性）であるという結果を得ている。この結果から、少なくとも当時の味噌に大腸菌が混入している可能性は低かったといえる。なお黄色ブドウ球菌は食品中で 10^5 CFU/g 以上増殖しないと発症に足る量のエンテロトキシンが生産されず、0.83 未満の水分活性では増殖しない^{iv)}。表 1 にもあるように、食塩濃度 5.5% (w/w) の味噌検体においてもこの条件は満たされているため、単体の味噌に黄色ブドウ球菌が混入したとしても、その中で菌が増殖する可能性は無視しうる。

味噌の中に大腸菌が混入した場合を想定した接種試験として、以下のようなものが報告されている。窪田ら⁸⁾によると、食塩濃度 0, 2.6, 5.2, 8.6 および 12.3% の味噌製品に非病原大腸菌 8 log CFU/g を混入し、30℃で保存した場合、7 日後には無塩味噌を含め、全ての検体で菌数が検出限界以下まで低下した。試験に使用した味噌の pH は 4.81～

5.02，水分活性は 0.752（塩濃度 18.3%）～0.903（塩濃度 0%）で、供試大腸菌株の増殖下限環境に近かった。無塩味噌で大腸菌数が 6 log CFU/g から 1 log CFU/g まで落ちるのに必要な時間は 5℃で 20～30 日、室温（12.0～34.5℃）で 4～6 日、30℃で 4 日であった。食塩濃度 11.2% の味噌検体においては、大腸菌数が 7 log CFU/g から 1 log CFU/g まで落ちるのに必要な時間は 5℃で 10 日、室温で 2～4 日、30℃で 2 日であった。また、島村らにより 20 種の市販味噌（米味噌 15 種、豆味噌 1 種、麦味噌 2 種、調合味噌 2 種）の表面に大腸菌を塗布した際の菌の消長に関する実験結果が報告されている¹⁶⁾。それによると、味噌塗抹後、4℃、28 日間の保存後に 4 log CFU/g 以上生残した米味噌 3 検体（味噌 100 g に対する塩分含有量が 10 g 以上のもの；2 検体、5 g 未満のもの；1 検体）が確認され、死滅速度の差異は主原料や食塩含有量以外の要因が関与している可能性が指摘されている。本研究で得られた結論のうち、保存温度の影響については、上述した先行研究による知見とおおむね一致する傾向がみられた（図 1～4）。すなわち、8 log CFU/g という極めて高い菌数から開始した場合でも、常温（20℃）で保存するとほとんどの場合、2 週間以内に検出限界以下まで生菌数が低下した（しかし例外的に 16 日目に 2-3 log CFU/g の生菌数を示す場合もみられた）。30℃で保存すると、ほとんどの場合、6 日以内に検出限界以下まで生菌数が低下した（しかし例外的に 6 日目に 2 log CFU/g の生菌数を示す場合も見られた）。一方、10℃保存で同様の状況に至るのに必要な日数は少なくとも 77 日である。5℃では更に長期間大腸菌 O157 は生存し、112 日後においてもまれに 3 log CFU/g の生菌数を示す場合があることが判明した。また、一般的に低水分活性環境は微生物の発育を抑制する因子であるが、本試験では低水分活性環境において長期的に大腸菌 O157 の生残が観察された。こ

の現象は、微生物の代謝消耗が一因であると考えられる。増殖できない環境において微生物は死滅過程をたどることになるが、高食塩濃度、低水分活性、低 pH 環境等、微生物の増殖の限界値に近い環境で安定した食品において、死滅しない程度の損傷を被った菌は、貯蔵温度が微生物の至適増殖温度に近いほど細胞修復のためのエネルギー消費が活発となり、その結果、エネルギーの枯渇を経て死滅が進むといわれている¹⁷⁾。本研究で観察された現象は、味噌に混入した大腸菌 O157 が高食塩濃度環境に起因する浸透圧ショック等による菌体損傷の修復を行う中で、微生物代謝に必要な自由水がより多い環境（水分活性値 上位 4 分の 1 層）でエネルギー消費が進み、より迅速に死滅に至ったと示唆された。低温貯蔵、低水分活性環境は微生物の増殖抑制に有効である一方、製造後の味噌に有害微生物が混入した場合には、それがより長期間生残する原因になりうることが示された。

以上の結果から、味噌中に大腸菌が混入した場合に菌が増殖することはないものの、保存温度の如何によっては長期間にわたり菌が残存する場合もありえることが判明した。とはいえ、通常の味噌の流通過程から考えると、パッケージ直前にごく微量 (2log CFU/g 程度) の大腸菌 O157 が混入したとしても、常温流通の過程でほとんどの場合は完全に死滅することが期待できる。それ以前の製造段階で大腸菌 O157 が混入した場合についてはこの結果から明確なことは言えないが、「仕込み混合時に大腸菌を 4 log CFU/g 混入させ、30℃ 熟成中の菌数変化を測定したところ、塩濃度 0~12% のいずれの検体も 2~4 日で検出限界以下まで菌数が低下した」という報告⁹⁾を踏まえるに、仕込み後の熟成過程において混入した大腸菌 O157 は製品の出荷前に死滅しているものと考えることが妥当であろう。一方、調理現場等で市販味噌製品の開封後に大腸菌 O157 汚染が発生した場合、その後の常識的な期間の低温保存では菌の死滅が期待できない (図 1)。それゆえに味噌に関しては、開封後 (商品購入後) に交差汚染の防止を図ることが、食中毒防止のためには重要であるといえる。

本実験の結果、大腸菌 O157 の生存・死滅性に関して原料の違いによる有意な差が見られておらず、また、味噌の水分活性の差異により大腸菌 O157 の死滅性に影響を与える傾向がみられたものの、pH、エタノール濃度、食塩濃度の検討項目を含めて、大腸菌 O157 の死滅性の間に明確な関連も見られなかった (表 2)。上述した結論は、大抵の市販味噌について妥当するものと考えられる。ただし、近年の消費者ニーズを受けて開発が進んでいる粉末味噌、チューブ入り味噌等、今回の試験に利用した商品の物性値から大きく外れた製品についてまで、本研究の結果が適用できるか否かについては不明である。

4. 要 約

味噌に混入させた大腸菌 O157 の消長を明らかにするた

めに、市販味噌 24 検体を対象に複数の保存試験区 (5, 10, 20, 30℃) における大腸菌 O157 生菌数の変動を寒天平板法および MPN 法により観察した。全保存試験区において、味噌混入下の大腸菌 O157 は増殖することなく段階的に死滅し、その死滅速度と味噌原料 (米, 麦, 大豆) に関連は見られなかった。一方、味噌検体の水分活性値が大腸菌 O157 の死滅速度に影響を与える可能性を示した。本結果により、大腸菌 O157 が意図せず味噌に混入した場合であっても、常温での流通、保存の期間に死滅することから、そのリスクは実質的に無視しうるものであると推察された。

本研究は (一社) 中央味噌研究所の委託研究と試験材料の提供にもとづき実施した。関係者各位に感謝申し上げる。

文 献

- 1) Meng, J., Doyle, M.P., Zhao, T., and Zhao, S. (2001). 10 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, In "Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 2nd. edition," ed. by Doyle, M.P., and Beuchat, L.R., ASM Press, Washington, D.C., pp. 193-213.
- 2) 加藤妙子, 小川由高, 中野京子 (2017). 第 59 回全国味噌鑑評会出品味噌の総合結果. 中央味噌研究所報告, **38**, 6-33.
- 3) 好井久雄 (1979). 醸造食品と水分活性. 日本醸造協会雑誌, **74** (4), 213-218.
- 4) 松本伊佐尾 (1993). 発酵・熟成からみた品質保持技術. 味噌の科学と技術, **41** (12), 428-435.
- 5) Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P., and Doyle, M.P. (1992). Fate of *Escherichia coli* O157: H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58** (8), 2513-2516.
- 6) Garren, D.M., Harrison, M.A., and Russell, S.M. (1997). Retention of acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* O157: H7 and non-O157: H7 isolates. *J. Food Prot.*, **60** (12), 1478-1482.
- 7) Lee, S.Y. and Kang, D.H. (2016). Survival mechanism of *Escherichia coli* O157: H7 against combined treatment with acetic acid and sodium chloride. *Food Microbiol.*, **55**, 95-104.
- 8) Kubota, Y., Ito, K., and Mochizuki, K. (1981). Miso and pathogenic bacteria. *Journal of the brewing society of Japan (Nihon Jozo Kyokaishi)*, **76** (12), 821-826 (窪田 譲, 伊藤公雄, 望月 務. みそと病原細菌 食品衛生面からみた菌学的安全性, 日本醸造協会誌).
- 9) 伊藤公雄, 今井 学, 石神 実, 武田 茂, 安平仁美 (1983). みそ熟成過程における添加大腸菌の消長. 味噌の科学と技術, **31** (3), 102-106.
- 10) Ito, K. (1989). Presence and behavior of hygienic bacteria in miso. *Journal of the brewing society of Japan (Nihon Jozo Kyokaishi)*, **84** (10), 680-686 (伊藤公雄. 味噌の衛生細菌とその挙動, 日本醸造協会誌).
- 11) 伊藤公雄 (1999). 味噌中におけるサルモネラ菌 (*Salmonella enteritidis*) の生菌数の推移. 味噌の科学と技術, **47** (7), 243-246.
- 12) Inatsu, Y., Ohata, Y., Ananchaipattana, C., Latiful, Bari M., Hosotani, Y., and Kawasaki, S. (2016). Fate of *Escherichia coli* O157 cells inoculated into lightly pickled chinese cabbage during processing, storage and incubation in artificial gastric juice. *Biocont. Sci.*, **21** (1), 51-56.

- 13) Inatsu, Y., Latiful, Bari M., Kawasaki, S., and Isshiki, K. (2004). Survival of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* in kimchi. *J. Food Protect.*, **67** (7), 1497–1500.
- 14) Swaroop, S. (1956). Estimation of bacterial density of water samples; methods of attaining international comparability. *Bull. World Health Organization*, **14** (5–6), 1089–1107.
- 15) 伊藤公雄, 窪田 譲, 今井 学, 望月 務 (1976). みそ中の微生物 II みそにおける衛生細菌の有無. 味噌の科学と技術, **24** (2), 32–33.
- 16) 島村裕子, 増田修一 (2018). 各種味噌が食中毒菌に汚染された際の微生物学的安全性に関する網羅的解析. 中央味噌研究所研究報告, **39**, 70–82.
- 17) Leistner, L. and Gorris, L.G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, **6**, 41–46.

引用 URL

- i) 農林水産省「食品産業動態調査」(2018 年), https://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_doutai/attach/pdf/doutai_top-108.pdf (2020. 5. 20)
- ii) 農林水産省, 2018 年農林水産物・食品の輸出実績 (品目別), https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e_info/attach/pdf/zisseki-179.pdf (2020. 5. 20)
- iii) 全国味噌工業協同組合連合会, 『味噌製造における「HACCP の考え方を取り入れた衛生管理」のための手引書」Ver. 2.0, <https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/000502564.pdf> (2020. 5. 20)
- iv) 農林水産省, 食品安全に関するリスクプロファイルシート (細菌), https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/hazard-info.html#microbio (2020. 5. 20)
(令和 2 年 3 月 16 日受付, 令和 2 年 5 月 28 日受理)